

基于多维“蛛网”模式辨析黑骨藤追风活络胶囊治疗类风湿性关节炎的质量标志物

彭乐强, 刘育辰*, 刘刚*, 穆开朗, 周玲利, 冉飞, 云雪林
(贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 目的 基于多维“蛛网”模式辨析黑骨藤追风活络胶囊治疗类风湿性关节炎的质量标志物。方法 基于“传递与溯源”原则, 筛选由原药材传递至复方制剂的化合物; 基于特有性原则, 筛选复方中的指标成分; 基于配伍原则, 结合复方中原药材的配伍规律归属化合物; 基于可测性原则, 根据标准和文献的指标成分含量测定, 评价各成分的可测性; 基于有效性原则, 通过网络药理学研究对化学成分对应靶点数。绘制“蛛网”模式图, 按回归面积大小确定关键质量标志物, 分子对接法验证结果的可靠性。结果 青藤碱、千金藤宁碱、 Δ^5 -pregnene-3 β , 17 α , 20(S)-triol、periplocogenin、periplocoside M的综合回归面积排名较高, 能很好地结合类风湿性关节炎疾病靶点。结论 本研究结果可为黑骨藤追风活络胶囊治疗类风湿性关节炎的质量控制奠定理论基础。

关键词: 黑骨藤追风活络胶囊; 质量标志物; 5个原则; “蛛网”模式; 网络药理学

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)03-1024-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.03.050

黑骨藤追风活络胶囊由黑骨藤、青风藤、追风伞组成, 是根据苗族医药理论, 按照现代制药技术制成的苗药复方制剂, 具有祛风除湿、通络止痛功效^[1], 临床上用于治疗类风湿性关节炎, 疗效显著^[2-3]。但黑骨藤追风活络胶囊的药效物质基础尚不明确, 现行质量标准仅有薄层鉴别、显微鉴别^[4-5]及单一指标成分青藤碱的含量测定, 无法反映该制剂质量的整体性及质量内涵。

由于药材的来源、配伍及工艺不同, 复方制剂中的化学成分种类和含量波动较大, 增加了质量标准建立的复杂性^[6]。刘昌孝院士提出中药质量标志物(Q-marker)的理念, 即存在于中药材和中药产品中固有的或加工制备过程中形成的, 与中药的功能属性密切相关的化学物质, 作为反映中药安全性和有效性的标志性物质进行质量控制, 具有传递与溯源、特有性、复方配伍、可测性、有效性5个原则^[7]。

“蛛网”作为一种多指标的可视化分析模型, 可综合分析多个指标对整体的影响。本研究从Q-marker的5个原则和多维“蛛网”模式, 辨析黑骨藤追风活络胶囊抗类风湿性关节炎的Q-marker, 并结合分子对接技术评估蛋白质-配体结合潜能, 验证结果的可靠性, 以期为进一步构建更加科学的质量评价体系提供科学依据。

1 数据库与软件

Cytoscape 3.10.0 软件, PyMol 2.4.0 软件, Auto Dock Vina 1.1.2 软件, TCMSP (<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>) 平台, SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库, PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库, DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) 数据库, TTD (<https://db.idrblab.net/ttd/>) 数据库, DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 数据库, OMIM (<https://www.omim.org/>) 数据库, GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库, UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库, RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库。

2 方法与结果

2.1 基于“传递与溯源”的Q-marker辨析 查阅相关文献从黑骨藤追风活络胶囊三味原料药材中共辨识出346个化合物, 其中从黑骨藤辨识出138个化合物, 主要为强心苷类、黄酮类、苯丙素类等^[8-9]; 从青风藤中共辨识出91个化合物, 主要为生物碱类、挥发油类等^[10]; 从追风伞中共辨识出117个化合物, 主要为黄酮类、挥发油类等^[11-12]。

课题组前期采用UPLC-Q-TOF-MS/MS联用技术快速分析了黑骨藤追风活络胶囊的化学成分^[13], 共鉴定出80个

收稿日期: 2024-07-23

基金项目: 贵州省基础研究(自然科学)项目(黔科合基础-ZK[2025]面上171); 贵州省教育厅科技拔尖人才项目(黔教技[2022]083号)

作者简介: 彭乐强(1999—), 男, 硕士生, 从事中药民族药化学及药效物质基础研究。E-mail: penglq2208@163.com

*通信作者: 刘育辰(1982—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药及民族药资源分类鉴定与质量控制研究。E-mail: lyc8564732@163.com

刘刚(1979—), 男, 高级实验师, 硕士生导师, 从事中药、民族药化学及中药新药的研究。E-mail: liugang888_2000@163.com

化合物, 主要包括苯丙素类、黄酮类、生物碱类、甾体皂苷的化合物有 80 个可以“传递”到制剂中, 见表 1。
苷类及少量的核苷和脂肪酸等化学成分。原料药材中含有

表 1 黑骨藤追风活络胶囊主要化学成分

药材	类型	名称	分子式		
青风藤	生物碱类、糖苷类	青藤碱氮氧化物鼠李糖苷	C ₂₅ H ₃₃ NO ₉		
		去甲乌药碱葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₇ NO ₈		
		去甲乌药碱葡萄糖苷异构体	C ₂₂ H ₂₇ NO ₈		
		去甲乌药碱	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃		
		去甲青藤碱葡萄糖苷	C ₂₄ H ₃₁ NO ₉		
		尖防己定碱	C ₁₉ H ₂₄ NO ₆ Cl		
		双青藤碱	C ₃₈ H ₄₄ N ₂ O ₈		
		青藤碱	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄		
		尖防己碱	C ₁₉ H ₂₄ NO ₆ Cl		
		去甲青风藤碱	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄		
		去氧青藤碱葡萄糖苷	C ₂₅ H ₃₄ NO ₈		
		dauricumine	C ₁₉ H ₂₄ NO ₆ Cl		
		双青藤碱异构体	C ₃₈ H ₄₄ N ₂ O ₈		
		土藤碱	C ₁₈ H ₁₉ NO ₃		
		木兰花碱	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄		
		异青藤碱	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄		
		紫堇定甲醚	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄		
		千金藤宁碱	C ₁₉ H ₁₈ NO ₄ ⁺		
		伪非洲防己碱	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄ ⁺		
		N-反式-阿魏酰酪胺	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄		
		四氢小檗碱	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄		
		chelidonine	C ₂₀ H ₁₉ NO ₅		
		nandazurine	C ₁₉ H ₁₄ NO ₅		
		8-氧代表小檗碱	C ₂₀ H ₁₇ NO ₅		
		去甲劳丹碱葡萄糖苷	C ₂₅ H ₃₃ NO ₉		
		黑骨藤	苯丙素类、有机酸、挥发油、甾体类、黄酮类、酚类、糖苷类	1-O-芥子酰基葡萄糖苷	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀
				绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
				隐绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
				3-O-咖啡酰-5-O-芥子酰奎尼酸	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃
				丁香脂素二葡萄糖苷	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₈
				丁香脂素二葡萄糖苷异构体	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₈
				丁香脂素-4-O-葡萄糖	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₃
				5-O-咖啡酰-3-O-芥子酰奎尼酸	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃
3-O-咖啡酰-4-O-芥子酰奎尼酸	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃				
4-O-咖啡酰-5-O-芥子酰奎尼酸	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃				
原儿茶酸	C ₇ H ₆ O ₄				
新绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉				
异绿原酸 B	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂				
异绿原酸 C	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂				
异绿原酸 A	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂				
cannabisin F	C ₃₆ H ₃₆ N ₂ O ₈				
cannabisin fisolmer	C ₃₆ H ₃₆ N ₂ O ₈				
1,2-methylenedioxy-3,10,11-trimethoxynoraporphine	C ₂₀ H ₂₁ NO ₅				
亚麻酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₂				
periplogenin-3-O-b-D-glucopyranosyl(1-4)-O-b-D-digitoxopyranoside	C ₃₅ H ₅₄ O ₁₃				
杠柳毒苷	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₃				
异槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂				
8-异戊烯基山柰酚-3-O-葡萄糖-7-O-鼠李糖苷	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₅				
羟基酪醇葡萄糖苷	C ₁₄ H ₂₀ O ₈				
cephatonine glucoside	C ₂₆ H ₃₅ NO ₁₀				
亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂				
追风伞	黄酮类、糖苷类、苷类、有机酸、酚酸类	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆		

续表 1

药材	类型	名称	分子式
		山柰酚-3-O-芸香糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
		山柰酚-3-O-葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
		槲皮素-3-O-鼠李糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
		山柰酚-3-O-鼠李糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
		8-异戊烯基山柰酚-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷	C ₃₈ H ₄₈ O ₂₀
		8-异戊烯基山柰酚-3,7-二葡萄糖苷	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₆
		8-异戊烯基	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₅
		槲皮素 3-O-(2"-对香豆酰基)-β-D-葡萄糖苷	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄
		山柰酚-3-O-(2"-对香豆酰基)-β-D-葡萄糖苷	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃
		山柰酚-3-O-芸香糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
		山柰酚-3-O-(3"-对香豆酰基)-β-D-葡萄糖苷	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃
		朝藿定 A	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀
		朝藿定 B	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉
		朝藿定 C	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉
		淫羊藿苷	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅
		8-异戊烯基山柰酚-3,7-二鼠李糖苷	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₄
		8-异戊烯基山柰酚-3-O-鼠李糖苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₀
		淫羊藿素-3-O-芸香糖苷	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅
		淫羊藿素-3,7-二鼠李糖苷	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₄
		淫羊藿-3-鼠李糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
		西伯利亚远志糖苷 A6	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₅
		periforoside E	C ₃₅ H ₅₂ O ₁₃
		3b-[(O-b-D-glucopyranosyl-(1-4)-b-D-cymarosyl oxy)-5b, 14b-dihydroxy-7-en-card-20(22) -enolide	C ₃₆ H ₅₄ O ₁₃
		尿苷	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆
		鸟苷	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅
		柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇
		奎宁酸	C ₆ H ₈ O ₇
		原儿茶醛	C ₇ H ₆ O ₃

2.2 基于成分特有性的 Q-marker 辨析 特有性指能代表和反映同一类药材的共有并区别于其他类药材的特征性成分,能反映同一类不同种药材的差异化成分^[14],明确特有性成分对 Q-marker 的确定有重要意义。

黑骨藤为萝藦科植物黑龙骨 *Periploca forrestii* Schltr. 的干燥根及全株,主要含有挥发油、皂苷、苯丙素以及黄酮、三萜等化学成分,特征性成分为 C₂₁ 甾类,如 Δ⁵-pregnene-3β, 17α, 20 (S) -triol、periplocogenin、periplocoside M^[15]。

青风藤,又名寻风藤、青藤,是防己科植物青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb) Rehd et Wils. 及毛青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb) Rehd. et Wils. var. *cinereum* Rehd. et Wils. 的干燥藤茎,主要含有生物碱、挥发油、甾醇等化学成分,具有抗炎镇痛、免疫抑制、抗肿瘤等作用,特征性成分为青藤碱、大黄素、钝叶素、橙黄决明素、6,8-二羟基-1,2,7-三甲氧基-3-甲基蒽醌、决明素、黄决明素^[10]。

追风伞是报春花科植物狭叶落地梅 *Lysimachia paridiformis* Franch. var. *stenophylla* Franch. 及落地梅 *Lysimachia paridiformis* Franch. 的干燥全草,含有大量黄酮类成分,具有多种药理活性^[16-17],特征成分尚未明确。

2.3 基于复方配伍规律的 Q-Marker 辨析 中药复方以

“君臣佐使”为配伍原则,君药是指在处方中对主证或主病起关键治疗作用的药物药力居方剂组分之一首;臣药是指辅助君药、可有效强化主病和主证治疗效果的药物;佐药有多重含义,可配合君臣药治疗兼证,可抑制君臣药的毒性,可与君药药性相反起反佐作用;使药,一是引经药,即能引导方中诸药至特定病所,二是调和不同药物^[18]。

苗药复方的组方结构一般为领头药、铺底药和引经药。领头药在全方中发挥重要的作用,治疗疾病的主要病因,铺底药起辅助主药发挥疗效或治疗疾病兼症的作用,地位稍次于主药;引经药起到引导主药和辅药到达病位、缓和药物毒性、加强人体营养的作用^[19]。

黑骨藤追风活络胶囊组方中黑骨藤为开路药,兼作领头药、母药,青风藤重用,为本方铺底通气散血药、治毒药,再配伍长于赶风毒的追风伞以全清毒治法,与青风藤合用作为本方铺陈治毒基底的药物组合,见图 1。在中药和苗药的配伍结构中,君药和领头药、臣药与铺底药、佐药和引经药有着共通之处^[20],由此可在基于复方配伍规律的赋值中,将黑骨藤追风活络胶囊组方药材与中药的“君臣佐使”结构类比而进行赋值。

2.4 基于成分可测性的 Q-marker 辨析 2020 年版《中国药典》明确规定了青风藤的测定方法和限度要求为含青藤

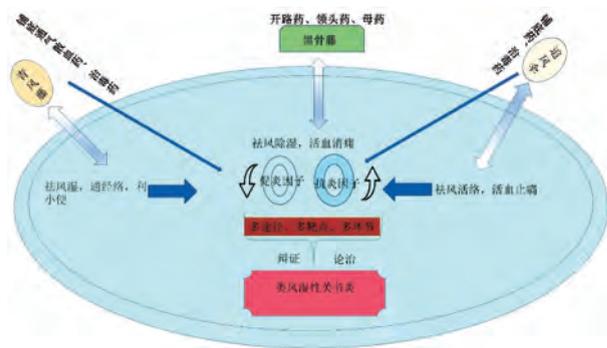


图1 黑骨藤追风活络胶囊组方配伍图

碱 $\geq 0.50\%$, 其他文献表明木兰花碱、四氢表小檗碱、青风藤碱、sinoracutine、蝙蝠葛碱、伪非洲防己碱、延胡索乙素、尖防己碱等为青风藤含量测定的指标成分^[21-22]。课题组前期研究表明, 黑骨藤含量测定的指标成分新绿原酸 $\geq 0.245\%$ 、绿原酸 $\geq 0.933\%$ 、隐绿原酸 $\geq 0.263\%$ 、异绿原酸 B $\geq 0.0056\%$ 、异绿原酸 A $\geq 0.012\%$ 和异绿原酸 C $\geq 0.059\%$ ^[23], 且杠柳毒苷^[24]、槲皮素-3-O- α -L-吡喃阿拉伯糖苷等也有文献报道^[25]。芦丁、槲皮素、山柰酚、木犀草素和刺槐素等为追风伞含量测定的指标成分^[26-27]。

2.5 基于有效性的 Q-Marker 辨析 网络药理学具有整体性、系统性的优点, 在中药质量控制方面, 其可作为辅助分析方法用于挖掘和验证潜在的中药质量标志物。本研究以类风湿性关节炎为疾病模型, 筛选青风藤、黑骨藤、追风伞与其相关的活性成分, 综合预测潜在的 Q-Marker。

在 TCMS 数据库中收集青风藤的化学成分, 并在文献中检索出黑骨藤^[8-9]、追风伞^[11-12]等化学成分。根据其口服生物利用度 $\geq 30\%$ 、类药性 ≥ 0.18 , 筛选出其中的活性成分。通过 ChemDraw 软件画出通过筛选的各成分结构, 保存为“sdf”格式并在 PubChem 数据库搜索, 得到各成分的 SMILES 号, 再使用 Swiss ADME 平台进一步筛选, 以胃肠道吸收评分为“高”, 药物样通过 (Lipinski 五原则、Ghose、维伯法则、Egan、Muegge) 至少 2 个“是”为标准进行筛选^[28], 在 SwissTargetprediction 平台预测条件符合的活性成分, 取二者交集成分。在 UniProt 数据库中对预测的靶点进行修正, 剔除非人基因, 从而获得黑骨藤追风活络胶囊化学成分的潜在靶点。结果, 共筛选出 37 个活性成分, 其中黑骨藤 17 个、青风藤 7 个、追风伞 8 个; 青风藤、黑骨藤共同成分 1 个, 青风藤、追风伞共同成分 1 个, 黑骨藤、追风伞共同成分 3 个。通过 DisGeNET、TTD、OMIM、DurgBank、GeneCard 数据库^[29]搜集类风湿性关节炎“rheumatoid arthritis”相关疾病靶点, 共获得 1 869 个靶点, 将 37 个活性成分作用靶点与疾病靶点取交集, 获得共有靶点 331 个, 定义为黑骨藤追风活络胶囊治疗类风湿性关节炎的有效靶点。导入 Cytoscape 3.10.0 软件构建“药材-活性成分-基因靶点关联网络图”, 见图 2, 相关参数和药物分析见表 2。总结表 2 中活性成分和各活性成分对应靶点信息, 将活性成分进行有效性赋值 $E = 80\%e$, 其中 e 为活性成分对应的关键靶点数。

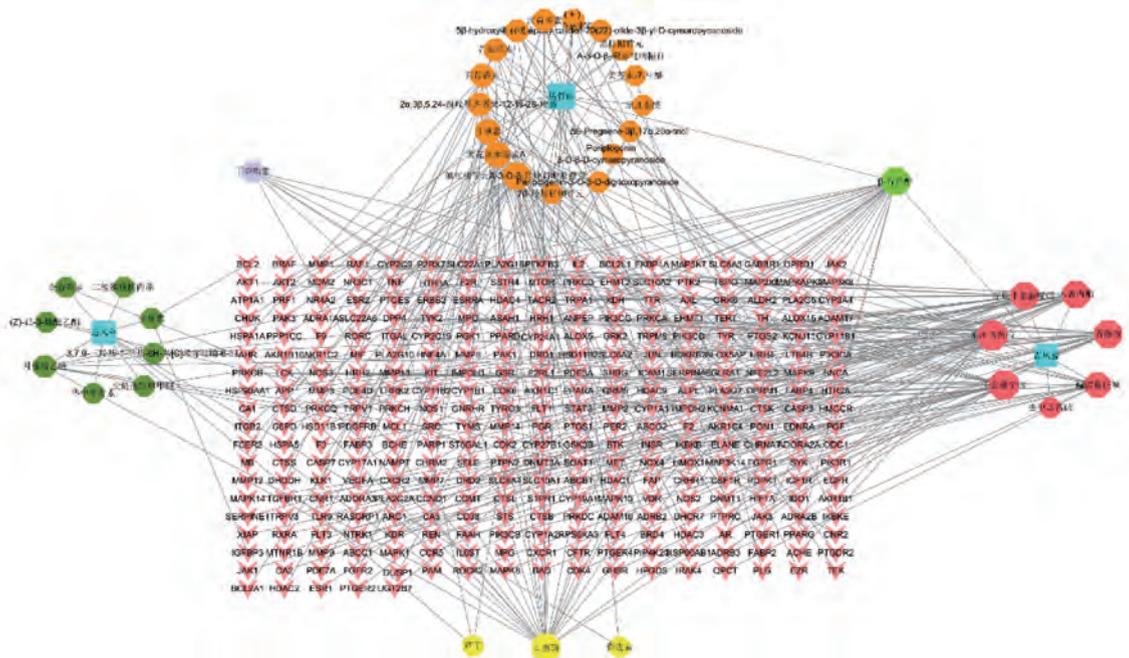


图2 药材-活性成分-基因靶点关联网络图

2.6 基于“蛛网”模式构建黑骨藤追风活络胶囊多维特征网络 采用“蛛网”模式结合 Q-Marker 筛选的 5 个原则构建多维特征网络, 以回归面积进行综合评价, 公式为 $S = \frac{1}{2} \sin \alpha \times (\sum_{i=1}^n p_i \cdot p_{i+1} + p_n \cdot p_1)$, 其中 S 为候选成分的回

归面积, α 为相邻 2 个维度之间的夹角, p 为候选成分不同维度的得分。

黑骨藤追风活络胶囊中各味药材主要化学成分共 346 种, 由于原料药材和复方制剂中的化学成分不同, 基于化合物的传递与溯源原则, 赋予 80 个制剂中成分数值 $p_i = 30$,

表2 活性成分靶点数及其在药材中的分布情况

成分	胃肠道吸收	Lipinski五原则	Ghose	维伯法则	Egan	Muegge	药材分布	靶点数/个
衡州乌药碱	高	是	是	是	是	是	青风藤	63
β-谷甾醇	—	—	—	—	—	—	青风藤、黑骨藤	38
丁香脂素	高	是	是	是	是	是	青风藤、追风伞	9
青藤碱	高	是	是	是	是	是	青风藤	43
左旋千金藤啶碱	高	是	是	是	是	是	青风藤	48
千金藤宁碱	高	是	是	是	是	是	青风藤	49
木香内酯	高	是	否	是	是	否	青风藤	59
蝙蝠葛任碱	高	是	是	是	是	是	青风藤	50
去甲乌药碱	高	是	是	是	是	是	青风藤	3
山柰酚	高	是	是	是	是	是	黑骨藤、追风伞	49
槲皮素	高	是	是	是	是	是	黑骨藤、追风伞	4
汉黄芩素	高	是	是	是	是	是	黑骨藤	10
芒柄花素	高	是	是	是	是	是	黑骨藤	11
黄芩素-7-甲醚	高	是	是	是	是	是	黑骨藤	4
甘草素	高	是	是	是	是	是	黑骨藤	24
高丽槐素	高	是	是	是	是	是	黑骨藤	13
黄花菜木脂素 A	高	是	是	是	是	是	黑骨藤	41
东莨菪素	高	是	是	是	是	否	黑骨藤	14
2α,3β,5,24-四羟基齐墩果-12-烯-28-羧酸	高	是	否	是	是	是	黑骨藤	22
滇杠柳苷元 A-3-O-β-洋地黄吡喃糖苷	高	是	否	是	是	是	黑骨藤	46
滇杠柳苷元 A-3-O-β-磁麻吡喃糖苷	高	是	否	是	是	是	黑骨藤	13
periplogenin-3-O-β-D-digitoxopyranoside	高	是	否	是	是	是	黑骨藤	1
periplogenin 3-O-β-D-cymaropyranoside	高	是	否	是	是	是	黑骨藤	1
7β-羟基杠柳苷元	高	是	是	是	是	是	黑骨藤	1
Δ5-pregnene-3β,17α,20α-triol	高	是	是	是	是	是	黑骨藤	3
5β-hydroxy-8,14β-epoxy-carden-20(22)-olide-3β-yl-D-cymaropyranoside	高	是	否	是	是	是	黑骨藤	7
(+)-丁香树脂醇	高	是	是	是	是	否	黑骨藤	12
原儿茶醛	高	是	否	是	是	否	黑骨藤	2
芦丁	—	—	—	—	—	—	黑骨藤、追风伞	2
3,7,9-三羟基-1-甲基-6H-苯[C]苯并吡喃-6-酮	高	是	是	是	是	是	追风伞	5
金合欢素	高	是	是	是	是	是	追风伞	1
华中冬青素	高	是	是	是	是	是	追风伞	1
(Z)-己-3-烯酸乙酯	高	是	否	是	是	否	追风伞	5
二氢猕猴桃内酯	高	是	是	是	是	否	追风伞	2
月桂酸乙酯	高	是	是	否	是	否	追风伞	16
柚皮素	高	是	是	是	是	是	追风伞	2
交链孢酚单甲醚	高	是	是	是	是	是	追风伞	5

非制剂中成分 $p_{ii} = 10$ ；在特有性原则中，各药材总共特有性成分有 10 个，赋予 10 个特有性成分数值 $p_i = 30$ ，非特有性成分数值 $p_i = 10$ ；在配伍原则上，根据苗药组方配伍原则，赋予领头药数值 $p_i = 30$ 、铺底药 $p_{ii} = 20$ 、引经药 $p_{iii} = 10$ ；在有效性原则中，筛选出 36 个活性成分，按照公式计算将 37 个活性成分赋值；在可测性原则中，2020 年版《中国药典》收录药材的定量成分 1 个赋予数值 $p_i = 30$ ，有文献报道其含量测定的 21 个化学成分赋值 $p_i = 10$ ，无文献报道其含量测定的化学成分赋值 $p_i = 0$ 。计算回归面积，绘制“蛛网”模式图，见图 3，并计算 29 个候选成分的回归面积，见表 3、图 4。由此可知，排名前 5 的成分有青藤碱、千金藤宁碱、 $\Delta 5$ -pregnene-3 β , 17 α , 20 (S)-triol、periplocogenin、periplocoside M。

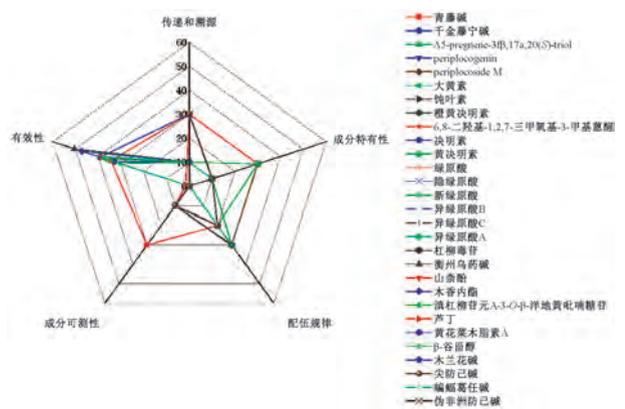


图3 29个候选成分的“蛛网”模式图

表3 29个候选成分回归面积

候选成分	传递和溯源	成分特有性	配伍规律	成分可测性	有效性	回归面积
青藤碱	30	30	20	30	34.4	1 980.19
千金藤宁碱	30	10	20	0	39.2	797.02
$\Delta 5$ -pregnene-3 β ,17 α ,20(S)-triol	10	30	30	0	0	570.66
periplocogenin	10	30	30	0	0	570.66
periplocoside M	10	30	30	0	0	570.66
大黄素	10	30	20	0	0	428.00
钝叶素	10	30	20	0	0	428.00
橙黄决明素	10	30	20	0	0	428.00
6,8-二羟基-1,2,7-三甲氧基-3-甲基蒽醌	10	30	20	0	0	428.00
决明素	10	30	20	0	0	428.00
黄决明素	10	30	20	0	0	428.00
绿原酸	30	10	30	10	0	428.00
隐绿原酸	30	10	30	10	0	428.00
新绿原酸	30	10	30	10	0	428.00
异绿原酸 B	30	10	30	10	0	428.00
异绿原酸 C	30	10	30	10	0	428.00
异绿原酸 A	30	10	30	10	0	428.00
杠柳毒苷	30	10	30	10	0	428.00
衡州乌药碱	10	10	20	0	50.4	382.34
山柰酚	10	10	30	0	39.2	376.64
木香内酯	10	10	20	0	47.2	367.12
滇杠柳苷元 A-3-O- β -洋地黄吡喃糖苷	10	10	30	0	36.8	365.22
芦丁	30	10	20	10	1.6	363.32
黄花菜木脂素 A	10	10	30	0	32.8	346.20
β -谷甾醇	10	10	30	0	30.4	334.79
木兰花碱	30	10	20	10	0	332.89
尖防己碱	30	10	20	10	0	332.89
蝙蝠葛任碱	10	10	20	0	40	332.89
伪非洲防己碱	30	10	20	10	0	332.89

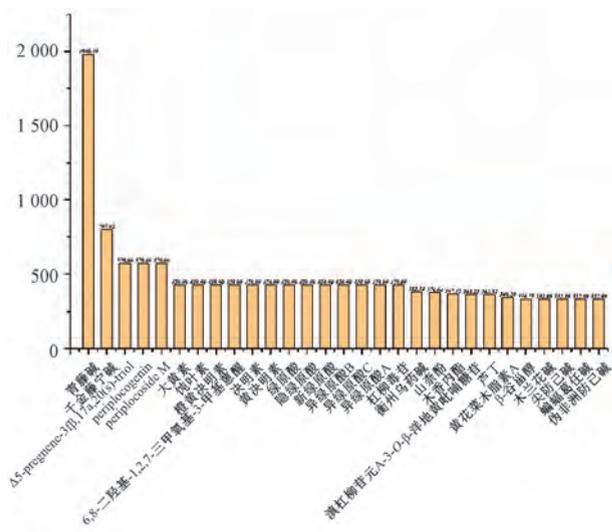


图4 29个候选成分的回归面积柱状图

2.7 分子对接 为进一步验证关键质量标志物的合理性,采用分子对接综合评估辨析的5个候选成分与靶点蛋白的结合力。首先将311个交集靶点进行PPI网络构建,筛选出度值排名前4位的靶点蛋白(STAT3、SRC、HSP90AA1、AKT1),采用Chem 3D 20.0软件对5个成分二维结构进行最小自由能结构优化,并保存为“mol2”格式。从蛋白质

数据库下载靶点蛋白受体,在PyMol 2.4.0软件中去除各受体的水分子和原晶配体,并进行加氢处理。采用Auto Dock Vina 1.1.2软件进行分子对接,记录最低结合能^[28]。结合能小于0说明分子之间具有结合活性,小于-5.0 kcal/mol说明分子之间具有较强的结合活性,能量越低结合能力越强^[30],结果显示该5个成分与核心靶点有着较好的结合能力,见图5。对结合能力较强的前四个构象进行可视化分析,见图6。

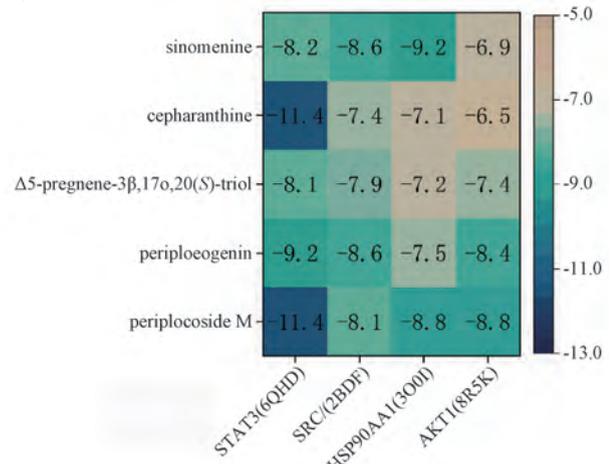


图5 各成分与核心靶点的结合能

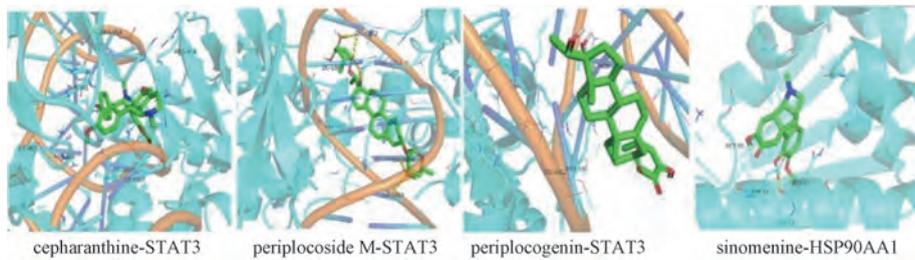


图6 结合能小于-9.1 kJ/mol的成分-蛋白对接构象

3 讨论与结论

本研究以Q-Marker的5个原则(传递与溯源、特有性、配伍原则、可测性和有效性为核心),对黑骨藤追风活络胶囊化学成分进行搜集与分析,并结合“蛛网”模式筛选,根据各候选成分回归面积,综合评价各候选成分对类风湿性关节炎的贡献程度,最终筛选出青藤碱、千金藤宁碱、 $\Delta 5$ -pregnene-3 β , 17 α , 20(S)-triol、periplocogenin、periplocoside M 5个成分为潜在Q-Marker,可作为黑骨藤追风活络胶囊治疗类风湿性关节炎的质量控制指标性成分。分子对接结果显示,该5个成分与类风湿性关节炎关键核心靶点对接分数均低于-5.0 kcal/mol,表明其能较好地与类风湿性关节炎相关靶点结合,潜在生物活性较高,黑骨藤追风活络胶囊治疗RA的靶点具有一定的分子基础。本研究结果可为黑骨藤追风活络胶囊质量控制和进一步开发利用提供科学依据,也可为苗药复方Q-Marker筛选提供新参考。

参考文献:

[1] 王和鸣,葛继荣,陈治英. 黑骨藤追风活络胶囊治疗痹病的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 1999, 7(2): 12-12.

[2] 古金华,吴娅琳,赵平. 黑骨藤追风活络胶囊联合甲氨蝶呤治疗类风湿性关节炎的临床分析[J]. 中国医药指南, 2018, 16(20): 219-220.

[3] 古金华,吴娅琳,陈文礼,等. 黑骨藤追风活络胶囊治疗风寒湿痹型类风湿性关节炎的临床疗效及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(3): 180-184.

[4] 耿亚,马永明. 黑骨藤追风活络胶囊质量控制的研究[J]. 中外医疗, 2010, 29(21): 128.

[5] 林佳任,毛大鸣. 苗药黑骨藤追风活络胶囊的鉴别研究[C]//2003全国苗医药学术研讨会特辑, 2003, 贵州: 贵阳中医学院学报编辑部, 2003: 242.

[6] 张亚,唐建飞,田清华,等. 基于“五原则”结合蛛网模型辨析舒筋活血胶囊中的质量标志物[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(9): 2440-2448.

[7] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.

[8] Chen L, Tang S Q, Li X J, et al. A review on traditional usages, chemical constituents and pharmacological activities of *Periploca forrestii* Schltr[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 271: 113892.

[9] 余玺,陈晨. 黑骨藤化学成分的研究[J]. 中成药, 2022, 44(6): 1845-1849.

[10] 罗艳群,沈小兰,蔡三金,等. 青风藤化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J]. 中草药, 2022, 53(3): 898-911.

[11] 李煦照,张帅男. 追风伞化学成分与药理作用的研究进展及治疗潜能的预测分析[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(3): 708-711.

[12] 陈秧,谢青玲,曹亮,等. 狭叶落地梅化学成分研究[J]. 中成药, 2023, 45(4): 1167-1172.

[13] Mu K L, Li L, Chen Y, et al. Analysis of chemical constituents of Miao Ethnomedicine Heiguteng Zhufeng Huoluo Capsule (HZFC) and the discovery of active substances in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *ACS Omega*, 2024, 9(9): 10860-10874.

[14] 张铁军. 基于中药质量标志物的中药产业高质量发展技术策略[J]. 中国现代中药, 2024, 26(2): 234-239; 233.

[15] 安兰兰,刘育辰,刘刚,等. 苗药黑骨藤研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(1): 136-141.

[16] 叶敏,孔维兵,王小英. 追风伞总黄酮提取工艺优选及其体外抗氧化作用考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 44-46.

[17] 齐柳娅,郁建平,田晶,等. 追风伞总黄酮抗风湿活性的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(4): 369-372.

[18] 庞枫唐,唐晓颇,徐浩东,等. 从中医学“君臣佐使”理论探索系统性红斑狼疮现代用药方案[J]. 风湿病与关节炎, 2022, 11(5): 48-50; 57.

[19] 杜江. 苗医的组方原则及方剂特点分析[J]. 中国民族医药杂志, 2006, 12(5): 35-36.

[20] 王彭,覃海龙,云雪林. 苗药性味与组方理论探析[J]. 江西中医药, 2016, 47(10): 8-9.

[21] 成洪达. 青风藤UPLC指纹图谱建立与3个生物碱含量测定[J]. 中药材, 2022, 45(12): 2943-2946.

[22] 尹茂静. 青风藤化学成分及生物活性研究[D]. 天津: 天津中医药大学, 2021.

[23] 安兰兰,李开敏,何倩倩,等. 基于6种咖啡酰基奎宁酸类成分结合化学计量法评价不同产地苗药黑骨藤的质量[J]. 中草药, 2020, 51(22): 5850-5855.

[24] 刘育辰,刘丽苹,刘刚,等. 苗药黑骨藤多指标的含量测定及聚类分析[J]. 中国药房, 2018, 29(12): 1636-1639.

[25] 陈华国,周欣,曹桂红,等. HPLC测定黑骨藤中槲皮素-

- 3-*O*- α -*L*-吡喃阿拉伯糖苷含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(10): 1284-1286.
- [26] 唐晓琴, 张丽艳, 黄颖, 等. 苗药追风伞药材质量标准提升研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(7): 36-40; 221.
- [27] 何焯林, 邵凤英, 穆开朗, 等. 苗药追风伞质量标准提升研究[J]. 广州化工, 2023, 51(1): 77-79; 141.
- [28] 曹小霞, 边子妍, 丁金国, 等. 基于网络药理学和分子对接
- 探讨瓜蒌皮注射液治疗冠心病的作用机制[J]. 天津中医药大学学报, 2024, 43(3): 193-200.
- [29] 罗欢, 熊凡捷, 沈涛. 茱萸圆方治疗动脉粥样硬化和高脂血症的网络药理机制探析[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(2): 292-297.
- [30] 蔡可珍, 郑琴, 朱徐东, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 结合网络药理学与实验验证探讨四君子汤治疗阿尔茨海默病的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(6): 1620-1631.

大补阴丸中醋龟甲的真伪鉴定研究

陈香¹, 韩婧², 王佳祺³, 彭江松², 曹邵阳², 宁艺柯², 夏国华^{2*}, 杨欢^{2*}

(1. 镇江市食品药品监督检验中心, 江苏镇江 212050; 2. 江苏大学药学院, 江苏镇江 212013; 3. 南京中医药大学附属镇江医院药剂科, 江苏镇江 212003)

摘要: 目的 建立大补阴丸中醋龟甲的真伪鉴定方法。方法 根据龟甲(乌龟)及其伪品(花龟、巴西龟和鳄龟)的线粒体基因序列差异设计了引物 WG、HG、BX 和 EG, 采用荧光定量 PCR 扩增 DNA 并进行方法学考察, 对 8 批大补阴丸中醋龟甲进行鉴定。结果 含有乌龟、花龟、巴西龟和鳄龟的 DNA 供试品在与上述引物经扩增后, 分别检测到了荧光信号, 并具备特定温度单一峰, T_m 分别为 75.40、79.12、80.16、78.82 °C; 最低检出限为 1×10^2 copies/ μ L, 重复性实验中 CV<1%; 分别有 2 批、1 批和 5 批大补阴丸中所含醋龟甲被鉴定为正品、掺伪品和伪品。结论 该方法可用于含醋龟甲制剂的质量控制; 大补阴丸中醋龟甲伪品较多, 其质量管理亟待加强。

关键词: 大补阴丸; 中成药; 醋龟甲; 特异性引物; 荧光定量 PCR

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)03-1031-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.03.051

龟甲为乌龟 *Chinemys reevesii* (Gray) 的背甲及腹甲, 归肝、肾、心经^[1]; 其炮制品醋龟甲临床应用较为广泛, 主要用于改善骨质疏松^[2]、贫血^[3]、免疫力低下^[4]等。然而, 由于龟科物种多样和各地使用习惯不同等, 市场上常见一些伪品, 如花龟 *Mauremys sinensis*、巴西龟 *Trachemys scripta* 和鳄龟 *Chelydra serpentina*^[5], 对龟甲及含龟甲制剂的安全与有效造成了不良影响。2020 年版《中国药典》一部所载“成方制剂”的“鉴别”和“检查”项下偶见醋龟甲的显微鉴别, 但其特征性较弱, 且其成分较复杂, 难以准确鉴定醋龟甲炮制品的真伪。

荧光定量 PCR 技术利用能与双链 DNA 非特异性结合的荧光染料或与目的片段特异性结合的荧光探针, 通过在扩增过程中采集荧光信号, 定性与定量分析未知 DNA 模板; 该技术灵敏度高、特异性强^[6-12], 近年来已应用于石斛、蜈蚣、藿香、人参、苍术、姜黄等中药的鉴别^[13-18]。

本研究根据龟甲及其伪品(花龟、巴西龟和鳄龟)的线粒体基因序列差异设计了物种特异性引物, 并通过荧光定量 PCR 建立了一种鉴定大补阴丸中醋龟甲成分真伪的检测方法, 可作为评价与监控该中成药质量的常规手段, 有助于保障其临床用药的安全性和有效性以及维护良好的市场秩序。

1 材料

1.1 仪器 Thermomixer Comfort 恒温混匀仪、MiniSpin 离心机(德国艾本德公司); AL104 电子分析天平(万分之一, 瑞士梅特勒-托利多公司); HS-840U 净化工作台(苏州净化设备有限公司); NanoDrop 1000 核酸蛋白分析仪、ABI StepOnePlus 荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.2 药物 乌龟、花龟、巴西龟和鳄龟分别于 2016 年至 2021 年购自全国各地水产市场, 并经 COI 条形码鉴定其基

收稿日期: 2024-10-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(82173937); 镇江市科技计划项目(SH2024055)

作者简介: 陈香(1981—), 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向为中药分析与质量控制。Tel: 13852909968, E-mail: chenxiang0917@163.com

* 通信作者: 夏国华(1977—), 男, 博士, 高级实验师, 研究方向为药理学。Tel: (0511) 85038451, E-mail: xgh-78131@yeah.net
杨欢(1980—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药学。Tel: (0511) 85038451, E-mail: yanghuan1980@ujs.edu.cn